

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA "*Rubus glaucus Benth*" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Christian Iván Zapata Maldonado

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE

RESUMEN

Se realizó cultivo *in vitro* de mora de castilla sin espina, utilizando el Sistema de Inmersión Temporal para evaluar la dependencia de la producción de *Rubus glaucus Benth* en la fase de multiplicación vegetativa con relación al tiempo de ciclo del SIT que fueron de 12, 15, y 18 horas; y con respecto al medio de cultivo de introducción del cual provinieron los explantes iniciales para el SIT. Como resultados se obtuvo que los mejores tratamientos para un buen desarrollo de los nuevos brotes que se obtendrán de la fase de multiplicación en el SIT son: tiempo de ciclo de 12 horas y medio de cultivo de introducción sólido; además, al realizar el análisis económico del proyecto se determinó que al multiplicar la mora sin espina en el SIT aumenta la producción con relación a la propagación tradicional y por ende disminuye los costos de producción, obteniendo una relación de ganancia de 5:1.

INTRODUCCIÓN

Estudios señalan que en el Ecuador ha aumentado la demanda de la mora de castilla (mora sin espina) en 3%, debido a que esta planta se encuentra relacionada con un mayor número de ramas productoras y un macollamiento entre 15% y 20% superior a la mora tradicional con espina, Ecuador se encuentra en pleno crecimiento en el ámbito agropecuario; constantemente se están desarrollando nuevas producciones comerciales, gracias a sus condiciones agroclimáticas.

La mora de Castilla contiene problemas de productividad en Ecuador, por el uso de propagación tradicional. Según Monteiro (2004), la mora es propagada por métodos vegetativos como: estacas y acodos; estos tipos de procesos facilitan la diseminación de plagas y enfermedades que afectan la calidad y cantidad de la producción y consecuentemente incrementan la pérdida económica para el productor; mientras que por el método *in vitro*, se obtendría un gran número de brotes a partir de cantidades mínimas de tejido (Pati, Sharma, Sood, & Ahuja, 2004).

Por tal razón se ha visto la necesidad existente de aumentar la multiplicación *Rubus glaucus Benth*, y para ello se usó una de las técnicas de propagación vegetativa que es el cultivo *in vitro*. Se empleó el Sistema de Inmersión Temporal (SIT), que aparte de abaratar costos de

producción y solucionar las dificultades de los cultivos estáticos, despliegan la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro*, permiten mayor facilidad de escalado y aumentan los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado (Pérez, Ponce, Jiménez, & Agramonte, 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de la dosis óptima de los fitoreguladores BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial.

ETAPA 0: Recolección y transporte del material vegetal

Las plantas muestreadas se seleccionaron *in situ* escogiendo los explantes con las mejores características: mayor número de hojas, libres de enfermedades; además plantas con un número de yemas adecuado y condiciones fisiológicas similares (Pierik, 1990).

ETAPA 1: Desinfección del material vegetal

El material vegetal fue lavado con detergente líquido, posteriormente se sumergieron en una solución de Benlate 2 g, Tetraciclina (1 capsula o 5 mg), jabón líquido (100 ml), yodo (5 ml) y

ácido cítrico (0.1 g), aforado a 4 litros de agua destilada durante 45 minutos.

Luego de la desinfección, se enjuagó con agua destilada tres veces por un minuto cada enjuague. Se cortó las varetas en trozos de 10 cm, dejando en el centro de cada corte de una a dos yemas.

El material vegetal fue trasladado a cámara de flujo laminar, y se los sumergió en una solución al 8% de cloro comercial durante diez minutos, se lavó con agua destilada tres veces seguidas durante diez minutos.

ETAPA 2: Introducción del material in vitro

Preparación del medio de cultivo para introducción

Se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sucrosa, 0.5 mL BAP [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$] y 0.1 mL AIA [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$]; se reguló el pH del medio de cultivo a 5.6, luego se adicionó 4g de agar y se lo disolvió a temperatura. Se dispensó 20ml de medio en envases previamente esterilizados y luego se autoclavaron los envases a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30 minutos.

Siembra del explante en el medio de cultivo

Luego de la desinfección, las miniestacas se sembraron en medios de cultivo de introducción estéril y trasladados al cuarto de crecimiento en el cual permanecieron por un período de quince a veinte días con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C .

ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión parcial.

Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación

Se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sucrosa, 1.3 ml BAP [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$], 0.3 ml AIA [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$]; $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CULTAR para cada tratamiento (Tabla 1); se reguló el pH del medio de cultivo a 5.6. Se autoclavaron los medios a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30 minutos.

Tabla 1 Concentración de paclobutrazol utilizado en el pretratamiento de multiplicación

de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en un Sistema de Inmersión Parcial.

Tratamiento	Reguladores	[CULTAR] $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
T1	BAP	0
T2	BAP+CULTAR	0.75
T3	BAP+CULTAR	1.25
T4	BAP+CULTAR	1.75

Selección y siembra de explantes en el medio de cultivo.

De la fase de introducción se seleccionó explantes que poseían características similares: longitud y grosor del tallo; sin presencia de contaminación, se cortaron los apicales para sembrar en los medios de cultivo de multiplicación. Posteriormente a las siembras, los cultivos fueron llevados al cuarto de crecimiento donde permanecieron por dos meses con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C .

Evaluación de tres tiempos de ciclo en la producción de explantes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth*, en la fase de multiplicación en el SIT.

ETAPA 3: Multiplicación de los brotes en sistema de inmersión temporal.

Preparación del medio de cultivo líquido para multiplicación

Se utilizaron las sales de Murashigue y Skoog al 50 % de macro y micronutrientes, adicionalmente se colocó $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sucrosa, 1.3 ml BAP [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$] y 0.3 ml AIA [$1500 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$]; se reguló el pH del medio de cultivo a 5.6. Se autoclavaron los medios a una presión de 15 PSI a 121°C durante 30 minutos.

Siembra del explante en el medio de cultivo

El sistema de inmersión temporal, estuvo conformado por dos frascos de vidrio de 850 ml de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos se conectaron entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro.

El medio de cultivo circuló de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de acuerdo al temporizador programable para determinar la frecuencia y duración de la inmersión. En la entrada de los frascos se colocó filtros hidrofóbicos ($0.20 \mu\text{m}$) para garantizar la

esterilidad del aire. La presión del aire fue regulada por un manómetro.

Se seleccionó explantes de la fase de introducción, que poseían características similares: longitud y grosor del tallo; sin presencia de contaminación, se cortaron los apicales para sembrar en los envases de los biorreactores correspondientes a los explantes. Después de la siembra, los cultivos fueron trasladados y permanecieron en el cuarto de crecimiento por un mes con luz artificial (16 horas luz y 8 horas oscuridad), temperatura promedio de 23°C. Una vez transcurrido el mes, se prosiguió a la toma de datos.

Programación del SIT

Se trabajó con el tiempo de inmersión constante de dos minutos, variando solo la frecuencia y el medio de introducción de los explantes iniciales del biorreactor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de la dosis optima de BAP o BAP+PBZ en medio de cultivo líquido en inmersión parcial para la multiplicación de mora sin espina Rubus glaucus Benth.

Se realizó la estandarización del medio de cultivo para multiplicación, mediante la aplicación de CULTAR (paclobutrazol) en cuatro diferentes concentraciones para homogenizar el crecimiento de los brotes.

Tabla 2 Prueba de Duncan. Variables analizadas en el ensayo de inmersión parcial

Trata.	Núm. de brotes		Longitud de brote (mm)		Diámetro del brote (mm)	
	Media		Media		Media	
T1	3.4	c	33.7	d	1.05	b
T2	3.3	b	3.9	c	1.10	c
T3	3.3	b	2.2	b	1.20	d
T4	0	a	0	a	0	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

En la variable número de brotes, el T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP) presentó un mayor número de brotes (3.4 brotes por explante); en la variable longitud del brote, T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP) presentó una mayor longitud de los brotes (33.7 mm); y para la variable diámetro del brote, tenemos que el T3 (1.3 mg.L⁻¹ BAP; 1.25 mg.L⁻¹ CULTAR) presenta el valor de la media de diámetro de

brote más alto (1.2±0.01 mm) con respecto a los otros tratamientos (Tabla 5).

Se obtuvo resultados positivos en los tratamientos T2 (BAP: 1.3 mg.L⁻¹; CULTAR: 0.75 mg.L⁻¹) y T3 (BAP: 1.3 mg.L⁻¹; CULTAR: 1.25 mg.L⁻¹), los cuales presentaron brotes homogéneos, pero disminución del número y de la longitud de los mismos; además, engrosamiento del diámetro de los tallos, y estos resultados son similares a los que describe Rodríguez, Aranguren, & Farrés (2005) en su investigación en la que trabaja con concentraciones de CULTAR de 0.125 mg.L⁻¹. Este resultado también fue similar a lo encontrado por Avilán, Soto, Escalante, Rodríguez, & Ruíz, (2003), quienes señalaron el efecto del paclobutrazol en el acortamiento del tamaño de los brotes.

Usando los datos de la longitud del brote en función de la concentración de CULTAR, se realizó una regresión lineal polinómica, en el que se graficó (Figura 7) y se calculó la ecuación del mismo, tomando como referencia 35 mm como longitud ideal para trabajar en multiplicación de mora en el SIT. Como resultado se obtuvo la siguiente ecuación: $y=0.006x^2-0.253x+1,786$, con una $R^2=0.973$. Donde x es la longitud del brote que se espera conseguir (35 mm) y y es la concentración de CULTAR que se desea encontrar.

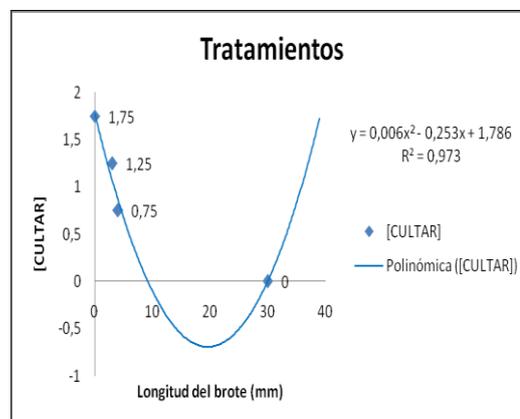


Figura 1 Regresión lineal polinómica de la concentración de CULTAR.

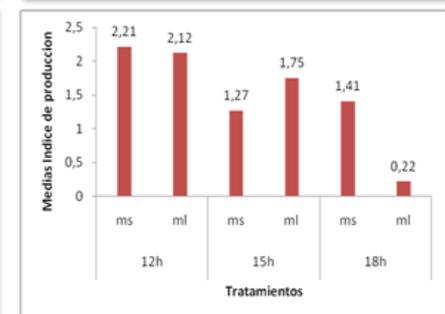
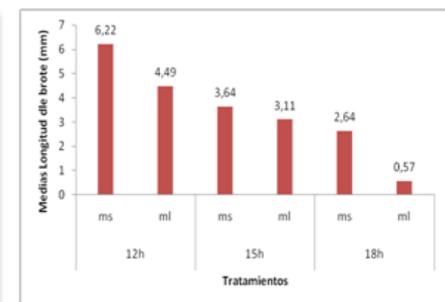
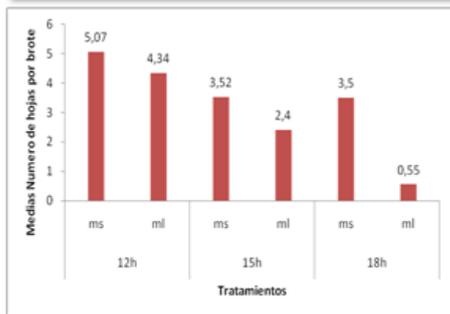
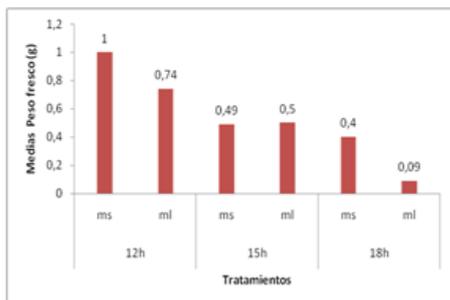
De esta manera se determinó que la concentración de CULTAR ideal es de $y=0.281$ mg.L⁻¹. Con esta concentración, teóricamente se podrá obtener brotes homogéneos y con la longitud del brote esperado.

Además se consideró el tratamiento T1 (1.3 mg.L⁻¹, BAP) como el más apto para continuar con la fase de multiplicación de mora en el Sistema de Inmersión Temporal ya que de acuerdo a la grafica se observa que a medida

que baja la concentración de CULTAR, la longitud del brote aumenta.

Evaluación de tres tiempos de ciclo de inmersión temporal y de la producción, para los explantes de mora sin espina *Rubus glaucus* Benth, en la fase de multiplicación del SIT.

Gráfico 1 Medias (Interacción Tiempo de ciclo-medio de introducción) de las variables peso fresco, longitud del brote, número de hojas por brote y índice de producción.



El valor de la media más alto para el peso fresco fue en el TR1 (12 horas, medio sólido)

($1\pm 0.04g$); para longitud del brote se obtuvo en TR1 (12 horas, medio sólido) (6.22 ± 0.12 mm); para la variable número de hojas por brote fue el de TR1 (12 horas, medio sólido) (5.07 ± 0.17 cm); y para el índice de producción corresponde al TR1 (12 horas, medio sólido) (2.21 ± 0.23) respecto a los demás tratamientos.

Según Castro & Gonzales (2002), para lograr un desarrollo en cultivo *in vitro* de tejidos, es necesario proveer a las plantas con suficientes nutrientes esenciales, de tal manera que no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. Por esta razón, los tratamientos T5 (18 horas, medio líquido) y T6 (18 horas, medio sólido) no reportaron multiplicación; Según Escaletes y Dosba, (1993), la fenolización se caracteriza por un cambio en la coloración del tejido de verde a café, y esto ocurre por no tener una buena disposición de bioreguladores; al igual como ocurrió en el presente trabajo, donde los explantes cambiaron de coloración de verde a café por la fenolización y además por la deshidratación que sufrieron al ser las frecuencias muy prolongadas.

Los resultados mostraron que hubo diferencias significativas entre tratamientos con el mismo tiempo de ciclo pero con los explantes iniciales provenientes de diferentes medios de cultivo de introducción. Es así que, T1, T3 y T5, a pesar de estar con T2, T4 y T6 respectivamente en el mismo tiempo de ciclo, tuvieron mayor índice de producción (mayor longitud del tallo, mayor número de hojas, mayor peso fresco) por provenir sus explantes iniciales de medio de cultivo de introducción sólido.

Estos resultados también se fundamentan según Debergh y Maene (1981), Robert y Smith (1990) y Preil y Hempfling (2002) mencionados por Bautista, et al., (2004), quienes afirman que los explantes que se encuentran en medio de cultivo líquido, la superficie del explante entra en contacto directo con el medio lo que permite la captación más eficaz de nutrientes y liberar los metabolitos tóxicos que pudieran acumularse en el área del tejido que se dispersan más rápido en el medio de cultivo líquido que en el sólido.

También puede atribuirse a una mayor absorción de los reguladores de crecimiento en el cambio de medio de cultivo de sólido a líquido (Jambhale, 2000). Varias investigaciones han demostrado que en el medio de cultivo líquido, la disponibilidad del agua, los minerales, y los reguladores de crecimiento, es mayor al compararlo con los medios de cultivo semisólido y sólido, lo que promueve un crecimiento más

acelerado (Debergh, Harbaoui, & Lemeur, 1981).

Además, se tuvo la particularidad de que los explantes de forma aleatoria, sin importar el tratamiento tuvieron la formación de brotes de dos formas: se formaron los brotes desde un punto de origen, y a lo largo del explante, esto se puede atribuir a una falta de distribución de luz o la disposición en la que se encuentren los explantes en el interior del biorreactor por la agitación que produce el medio cuando están en el tiempo de inmersión, ya que la dirección en la que crezcan los brotes de los explantes están condicionados por la producción de auxina, y esta tiende a acumularse en la parte de la planta que tiene sombra; por lo tanto si la planta no tiene sombra, la auxina bajará de la parte apical del explante a la base, promoviendo la formación de brotes de un mismo punto, caso contrario, saldrán a lo largo del explante (Squeo & Cardemil, 2006).

Análisis de costos

El análisis comparativo de gastos entre la multiplicación de mora en el SIT y de la forma convencional, mostró que la multiplicación en el SIT presenta menor costo y más utilidad que la multiplicación convencional. En el SIT, en el mejor tratamiento se obtuvo una producción de 170 plantas en un mes con un P.V.P. por planta de 7.48 USD y un retorno de 62 meses, mientras que multiplicando de forma convencional se obtiene una producción de 35 plantas en un mes con un P.V.P. por planta de 32.05 USD y un retorno de 296 meses. De esta manera se afirma que la razón de producción de mora *Rubus glaucus Benth* es de 5 a 1 entre la multiplicación en el SIT y de forma convencional respectivamente.

CONCLUSIONES

Para la multiplicación de mora en el SIT, el T1 (1.3 mg.L⁻¹ BAP, 0 mg.L⁻¹ CULTAR) dio mayor número de brotes (4 brotes por explante) y con mayor longitud (35mm) que T2 (3 brotes por explante; longitud del brote 30mm), T3 (3 brotes por explante; longitud del brote 20mm) y T4. El paclobutrazol, a concentraciones de 0.75 mg.L⁻¹ (T2) y 1.25 mg.L⁻¹ (T3), homogeniza la longitud de los brotes de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* sin inhibir su crecimiento y desarrollo por completo pero disminuye el número de brotes y su longitud.

El tratamiento que presentó mayor producción de mora sin espina *Rubus glaucus Benth* en el SIT son los biorreactores que trabajan con 12 horas de tiempo de ciclo y que sus explantes provienen de medio de introducción sólido.

Con la utilización del SIT se incrementa la producción de mora *Rubus glaucus Benth* en razón de 5:1 (Multiplicación SIT: P.V.P.=7.48; Multiplicación convencional: P.V.P.=32.05) con relación al método convencional lo que disminuye el costo de producción y aumenta las ganancias.

REFERENCIAS

ABT, A. E. (18 de 02 de 2010). Produccion de mora se incrementa. *Diario el Hoy* .

Avilán, L., Soto, E., Escalante, H., Rodríguez, M., & Ruíz, J. (2003). Manejo de altas densidades de población en mango. *Revista Digital del Centro Nacional de Investigación Agropecuarias de Venezuela* .

Castro, D., & Gonzales, J. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus gradis Hill ex Maiden*) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura sostenible* , 68-78. Colombia.

CIRAD, C. d. (2003). Recipiente con Inmersión temporal para cultivo de tejidos de plantas. *Las principales ventajas del sistema Rita* .

Debergh, P., Harbaoui, Y., & Lemeur, R. (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* , 53:181-187.

Jambhale, N. P. (2000). Efecto de la cantidad de subcultivos en la multiplicación in vitro de cuatro clones de banano. *INFOMUSA* , 10 (1).

Pati, P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. (Marzo de 2004). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Rosa Damascena Mill.* *BioOne 2010 US/Canada* , 40 (2) , 192-195.

Paucar, M. (2011). *Organogénesis directa in vitro a partir de explantes de hojas de mora (Rubus glaucus Benth)*. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de ciencias de la vida, Sangolquí.

Pierik, R. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. *L.M.S., Ayerbe, Trad. Mundi-Prensa* .

Rodríguez, K., Aranguren, M., & Farrés, E. (2005). Efecto del paclobutrazol en el desarrollo vegetativo e inicio de la floración en dos cultivares de mango (*Mangifera indica L.*). *Instituto de Investigación en Fruticultura Tropical* . Cuba.

Sigarroa, A., & García, C. (2011). Establecimiento y multiplicación in vitro de mora

de castilla (*Rubus Glaucus Benth*) variedad sin espina, mediante ápices meristemáticos.

Squeo, F. A., & Cardemil, L. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En *Fisiología Vegetal*. La Serena, Chile: Universidad de La Serena.

Stewart, C. (2008). Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications. *University of Tennessee* .